

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 109–115

Enzymatische Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum mit Analysenautomaten

Von J. Ziegenhorn

Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica Werk Tutzing, Forschungszentrum

(Eingegangen am 12. November 1974)

Eine einfache kinetische Methode zur automatischen Bestimmung des Gesamt-Cholesterins im Serum mittels Cholesterin-Esterase, Cholesterin-Oxydase, Katalase und Farbreaktion nach *Hantzsch* wurde entwickelt und das Verfahren auf die Analysenautomaten Braun SysteMatik, Eppendorf 5032, Greiner GSA II, Lars Ljungberg Autolab, Perkin-Elmer C4 und Perkin-Elmer C4B adaptiert. Die einzelnen Varianten der Methode ergaben bei der Untersuchung von Präzision, Richtigkeit und Störanfälligkeit zufriedenstellende Resultate.

Enzymatic method for the automated determination of total serum cholesterol

A simple kinetic method for the automated determination of total serum cholesterol was developed using cholesterol esterase, cholesterol oxidase, catalase and the color reaction according to *Hantzsch*. The procedure has been adapted to the Braun SysteMatik, Greiner GSA II, Eppendorf 5032, Lars Ljungberg Autolab, Perkin-Elmer C4 and Perkin-Elmer C4B analyzers.

The variants of the method yielded satisfactory results with regard of precision, accuracy and sensitivity to interferences.

Eine erhöhte Cholesterin-Konzentration im Serum stellt einen wichtigen Risikofaktor für arteriosklerotische Gefäßerkrankungen dar (1–3). Die quantitative Analyse des Serum-Cholesterins gehört daher zu den im klinisch-chemischen Laboratorium häufig auszuführenden Untersuchungen.

Die bisher gebräuchlichen Verfahren zur Bestimmung dieser Substanz mit Hilfe von Analysenautomaten basieren im wesentlichen auf der Reaktion nach *Sal-kowski, Liebermann* und *Burchard* (4–9). Wie die Untersuchungen verschiedener Autoren gezeigt haben, sind alle diese Methoden unspezifisch und störanfällig (7, 8). Ferner ist ihre Durchführung an Automaten infolge der Aggressivität der Reagenzien oft mit technischen Schwierigkeiten verbunden.

In der vorliegenden Arbeit wird eine enzymatische Methode zur Cholesterin-Bestimmung an Analysenautomaten beschrieben, die sich gegenüber den hergebrachten Verfahren durch eine bedeutend größere Spezifität und Praktikabilität auszeichnet. Bei dem neuen Verfahren werden die Cholesterin-Ester des Serums durch eine Cholesterin-Esterase gespalten und das freie Cholesterin durch eine Cholesterin-Oxydase in Δ^4 -Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgewandelt (10). Das Wasserstoffperoxid wird mittels Katalase und Farbreaktion nach *Hantzsch* (11) nachgewiesen. Da man bei

der Indikator-Reaktion für die Erreichung des Endwertes eine Inkubationsdauer von 60 min bei 37°C benötigt (10), wird die Bestimmung zur Abkürzung der Analysenzeit auf kinetischer Basis durchgeführt.

Von den bekannten Verfahren zur kinetischen Bestimmung von Konzentrationen ist die sog. "fixed-time"-Methode an Analysenautomaten besonders einfach und genau ausführbar (12, 13). Bei diesem Verfahren läßt man die Nachweisreaktion über ein festgelegtes Zeitintervall ablaufen und mißt nach dieser Zeit die Konzentration des entstandenen bzw. verbrauchten Farbstoffs. Das Zeitintervall muß so gewählt werden, daß sich eine direkte Proportionalität zwischen dem Meßsignal und der Anfangskonzentration der zu bestimmenden Substanz ergibt.

Aus theoretischen Betrachtungen verschiedener Autoren geht hervor, daß sich die Anwendung dieses Analysenverfahrens allgemein nur dann empfiehlt, wenn die Bestimmungsreaktion innerhalb des Meßzeitraums nach erster oder pseudoerster Ordnung abläuft (12, 13). Wie im nachstehenden gezeigt wird, lassen sich bei der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung Versuchsbedingungen finden, unter denen diese Voraussetzung über einen großen Meßbereich erfüllt ist. Damit eröffnete sich hier die Möglichkeit zur Ausarbeitung empfindlicher "fixed-time"-Methoden.

Material und Methoden

Reagenzien¹⁾

Die Cholesterin-Bestimmung wurde mit Hilfe der Biochemica-Test-Combination "Cholesterin, enzymatischer Farbtest" der Fa. Boehringer Mannheim GmbH durchgeführt. Die Testpackung enthält die Reagenzien Puffer/Katalase (0,6 mol/l Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7; 1,7 mol/l Methanol; ≥ 700 kU/l Katalase), Chromogen (2,5 mol/l Methanol; 0,42 mol/l Acetylaceton; 21 g/l Hydroxypolyäthoxydodecan), Cholesterin-Esterase (≥ 7 kU/l), Cholesterin-Oxydase (≥ 4 kU/l).

Aus diesen Reagenzien wurden die folgenden Gebrauchslösungen hergestellt:

1. Cholesterin-Reagenz (0,57 mol/l Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7; 1,7 mol/l Methanol; 20 mmol/l Acetylaceton; 1 g/l Hydroxypolyäthoxydodecan; ≥ 670 kU/l Katalase; ≥ 29 bis ≥ 41 U/l Cholesterin-Esterase; ≥ 33 bis ≥ 41 U/l Cholesterin-Oxydase).

2. Leerwert-Reagenz (Zusammensetzung wie Cholesterin-Reagenz, jedoch ohne Cholesterin-Oxydase).

Die Lösungen waren bei 25°C einen Tag und bei +4°C zwei Tage haltbar. Zur Kalibrierung wurde der wäßrige Standard Precimat Cholesterin (Boehringer Mannheim) verwendet, dessen Cholesterin-Gehalt 200 mg/100 ml (5,17 mmol/l) beträgt.

Geräte

Zur Bestimmung des Cholesterins wurden die Analysenautomaten Braun SysteMatik²⁾, Eppendorf 5032³⁾, Lars Ljungberg Autolab⁴⁾, Perkin-Elmer C4⁵⁾ und Perkin-Elmer C4B⁵⁾ eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen des Greiner-GSA II-Automaten⁶⁾ wurden mit einem geeigneten Schüttelgerät simuliert. Die kinetischen Untersuchungen sowie die manuellen Cholesterin-Bestimmungen wurden am Photometer Eppendorf³⁾ (thermostatisierter Küvettenhalter, Schreiber, Filter Hg 405 nm) durchgeführt.

Methoden

Die Bestimmung von Cholesterin-Esterase und Cholesterin-Oxydase sowie der manuelle Cholesterin-Test wurden nach I.c. (10) durchgeführt. Es wurden stets Doppelbestimmungen vorgenommen und die Mittelwerte berechnet. Über Einzelheiten der technischen Durchführung der Cholesterin-Analyse an den Automaten wurde bereits an anderer Stelle berichtet (14, 15).

Ergebnisse und Diskussion

Kinetik der Indikator-Reaktion

Für Reaktionen erster oder pseudoerster Ordnung, bei denen aus einem Mol des umzusetzenden Stoffes ein Mol Farbstoff entsteht und bei denen ferner die Extinktion der Farbstoff-Konzentration linear proportional ist, gilt (16):

$$\ln(E_{\infty} - E_t) = -kt + \ln E_{\infty}$$

Hier bezeichnet E_{∞} die Extinktion nach vollständigem Ablauf der Reaktion, E_t die Extinktion zu einem betrachteten Zeitpunkt t und k die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion. Der Gleichung ist zu entnehmen,

daß man eine Gerade erhält, wenn der Ausdruck auf der linken Seite graphisch gegen die Zeit aufgetragen wird. Diese Gesetzmäßigkeit wurde in Abbildung 1 zur Demonstration der pseudomonomolekularen Reaktionsabschnitte bei der vollenzymatischen Cholesterin-Bestimmung benutzt. Man sieht, daß die Indikator-Reaktion nach einer kurzen Verzögerungsphase über einen großen Zeitraum formal einer Kinetik erster Ordnung folgt.

Technische Gründe machten es an den Automaten erforderlich, die nicht-lineare Startphase in die Messungen

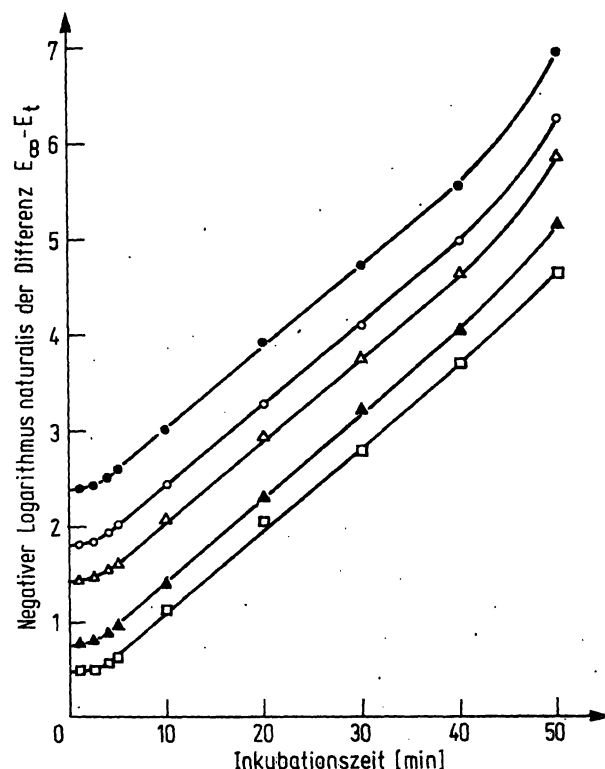


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Indikator-Reaktion bei der enzymatischen Cholesterin-Bestimmung. Ansatz Perkin-Elmer C4B (vgl. Tab. 1 und 2). Durchführung der Messung am Photometer Eppendorf bei Hg 405 nm und 37°C. Proben: Humansen.

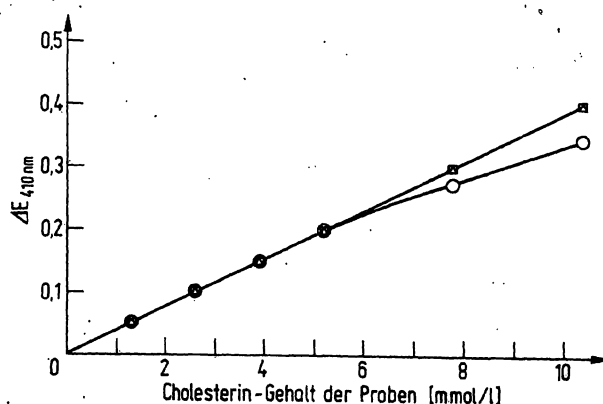


Abb. 2. Linearitätsbereich in Abhängigkeit von der Cholesterin-Oxydase-Konzentration im Test. Experimentelle Einzelheiten vgl. Tabelle 1 und 2, Methode Perkin-Elmer C4B. Proben: Preciset Cholesterin. Δ: 49 U/l Cholesterin-Oxydase. □: 24,5 U/l Cholesterin-Oxydase. ○: 12,3 U/l Cholesterin-Oxydase.

¹⁾ Enzyme: Cholesterin-Esterase (EC 3.1.1.13), Cholesterin-Oxydase aus *Nocardia erythropolis*, Katalase (EC 1.11.1.6).

²⁾ B. Braun Melsungen AG, Melsungen.

³⁾ Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg.

⁴⁾ AB Lars Ljungberg & Co, Stockholm.

⁵⁾ Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, Überlingen.

⁶⁾ Greiner Electronic AG, Langenthal, Schweiz.

einzu beziehen. Dabei zeigte sich, daß sich auch unter diesen Umständen noch Zeitintervalle finden ließen, in denen eine lineare Beziehung zwischen der Menge des gebildeten Farbstoffs und der Anfangskonzentration des Cholesterins bestand. An der Deutung dieses Sachverhalts wird gegenwärtig gearbeitet.

Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen

Die Abbildung 2 gibt das Resultat eines charakteristischen Optimierungsversuchs wieder, der bei der Entwicklung der Methoden für die Analysenautomaten durchgeführt wurde. Aus diesem Versuch und zahlreichen anderen Experimenten, bei denen jeweils die spezifischen Eigenschaften der Automaten wie Dosiervolumina, Inkubationstemperatur, Inkubationszeit und Verschleppung berücksichtigt werden mußten, folgten die in den Tabellen 1 und 2 zusammengestellten Bestimmungsansätze⁷⁾.

Alle Methoden waren technisch einfach an den Automaten durchzuführen, da nur zwei verschiedene Reagenzgemische benötigt wurden. Die Gemische mußten nicht vor Beginn der Analyse auf die Temperatur des Bestimmungsansatzes gebracht werden; sie konnten vielmehr während des Gebrauchs bei Raumtemperatur oder bei etwa + 4°C aufbewahrt werden.

⁷⁾ Da zur Entwicklung der Methode für den Greiner GSA II der Automat nicht zur Verfügung stand, wurden die Untersuchungen auf die Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen beschränkt. Die weitere Ausarbeitung der Methode erfolgte durch Jaag und Küffer (15).

Die Inkubationszeiten lagen zwischen 8,7 und 25 min, die Inkubationstemperaturen zwischen 37 und 45°C. Die mit dem Greiner GSA II erreichte, bemerkenswert kurze Inkubationszeit von 8,7 min ist darauf zurückzuführen, daß hier ein ununterbrochenes Mischen der Prozeßflüssigkeit erfolgt.

Die Berechnung der Cholesterin-Konzentration im Serum erfolgte bei allen Methoden unter Bezugnahme auf den wäßrigen Standard. Innerhalb einer Meßserie konnte jeweils mit einem aus der Standard-Extinktion ermittelten Faktor gearbeitet werden.

Charakterisierung der Methoden

Bei allen Methoden lag im Bereich von 0–12,93 mmol/l (0–500 mg/100 ml) Cholesterin eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Cholesterin-Konzentration vor (Abb. 2, 3, Tab. 3). Proben mit einem Cholesterin-Gehalt über 12,93 mmol/l ließen sich nach entsprechender Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung bestimmen. Durch den Verdünnungsschritt wurde die Richtigkeit der Meßwerte nicht beeinflusst. Die Empfindlichkeit der Methoden im niedrigen Konzentrationsbereich war ausreichend groß (Abb. 2, 3).

Für die Präzision in der Serie ergaben sich auf den Automaten trotz des Vorliegens von kinetischen Verfahren größtenteils bessere Resultate (Tab. 3) als im manuellen enzymatischen Test (10). Die Präzision von

Tab. 1. Bestimmungsansätze

I = Proben-Ansatz		II = Leerwert-Ansatz		Schichtdicke = 1 cm			
		Braun SysteMatik	Eppendorf 5032	Greiner GSA II	L. Ljung- berg Autolab	Perkin-Elmer C4	Perkin-Elmer C4B
Probe [ml]	I	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
	II	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01
Cholesterin- Reagenz [ml]	I	—	1,0	2,5	1,7	2,5	1,7
	II	—	—	—	—	—	—
Leerwert- Reagenz [ml]	I	2,5	—	—	—	—	—
	II	2,5	1,0	2,5	1,7	2,5	1,7
Cholesterin-Oxydase- Lösung*) [ml]	I	0,5	—	—	—	—	—
	II	—	—	—	—	—	—
bidest. Wasser [ml]	I	—	—	0,1	—	—	—
	II	0,5	—	0,1	—	—	—
Inkubations- temperatur [°C]		45	37	37	37	40	37
Inkubationszeit [min]		20	20	8,7	25	20	20
Umsatz (%)**)/ Inkubationszeit		89	82	54	81	90	86
Wellenlänge [nm]		Hg 405	Hg 405	Hg 405	410	410	410

*) Zusammensetzung: > 160 U/l Cholesterin-Oxydase.

**) Formaldehyd-Umsatz bei der Indikator-Reaktion.

Tab. 2. Konzentrationen im Test

I = Proben-Ansatz II = Leerwert-Ansatz

Substanz		Braun-SysteMatik	Eppendorf 5032	Greiner GSA II	L. Ljungberg Autolab	Perkin-Elmer C4	Perkin-Elmer C4B
Ammoniumphosphat-Puffer, pH = 7 [mol/l]	I	0,47	0,56	0,54	0,57	0,57	0,57
	II	0,47	0,56	0,54	0,57	0,57	0,57
Methanol [mol/l]	I	1,4	1,7	1,6	1,7	1,7	1,7
	II	1,4	1,7	1,6	1,7	1,7	1,7
Acetylaceton [mmol/l]	I	17	20	19	20	20	20
	II	17	20	19	20	20	20
Hydroxypolyäthoxy-dodecan [g/l]	I	0,83	0,99	0,95	0,99	0,99	0,99
	II	0,83	0,99	0,95	0,99	0,99	0,99
Katalase [kU/l]	I	≥ 550	≥ 660	≥ 640	≥ 660	≥ 660	≥ 660
	II	≥ 550	≥ 660	≥ 640	≥ 660	≥ 660	≥ 660
Cholesterin-Esterase [U/l]	I	≥ 24	≥ 35	≥ 39	≥ 33	≥ 29	≥ 33
	II	≥ 24	≥ 35	≥ 39	≥ 33	≥ 29	≥ 33
Cholesterin-Oxydase [U/l]	I	≥ 27	≥ 39	≥ 39	≥ 37	≥ 33	≥ 37
	II	—	—	—	—	—	—

Tab. 3. Präzision der Cholesterin-Bestimmung in der Serie

Methode	Probe		Analysenzahl [n]	Mittelwert [mmol/l]	Variationskoeffizient [%]
Braun SysteMatik	Preciset Cholesterin*), 1,29 mmol/l		22	1,29	2,73
	Preciset Cholesterin, 3,88 mmol/l		16	3,91	1,21
	Preciset Cholesterin, 10,35 mmol/l		16	10,37	0,66
	Precilip*), Nr. 318		15	3,85	1,08
	Humanserum		10	2,09	1,35
	Humanserum		13	6,85	0,89
	Humanserum		10	7,81	0,95
	Humanserum		24	9,08	0,81
Eppendorf 5032	Preciset Cholesterin, 1,29 mmol/l		22	1,29	2,36
	Preciset Cholesterin, 5,17 mmol/l		22	5,17	1,01
	Preciset Cholesterin, 10,35 mmol/l		22	10,40	1,23
	Precilip, Nr. 318		22	3,83	1,82
	Humanserum		21	1,19	2,21
	Humanserum		25	7,19	1,02
	Humanserum**)		25	13,22	2,25
L. Ljungberg Autolab	Preciset Cholesterin, 1,29 mmol/l		20	1,32	4,79
	Preciset Cholesterin, 2,59 mmol/l		20	2,56	2,14
	Preciset Cholesterin, 10,35 mmol/l		20	10,29	2,75
	Precilip, Nr. 320		20	3,60	3,37
	Humanserum		13	1,86	1,13
	Humanserum		20	6,05	1,37
	Humanserum		18	12,70	1,87
Perkin-Elmer C4	Preciset Cholesterin, 1,29 mmol/l		23	1,29	0,48
	Preciset Cholesterin, 3,88 mmol/l		24	3,88	0,43
	Preciset Cholesterin, 10,35 mmol/l		24	10,40	0,30
	Humanserum		16	7,03	0,62
	Humanserum**)		21	6,70	1,53
	Humanserum**)		20	7,73	1,12
Perkin-Elmer C4B	Preciset Cholesterin, 1,29 mmol/l		23	1,29	0,48
	Preciset Cholesterin, 3,88 mmol/l		24	3,88	0,43
	Preciset Cholesterin, 10,35 mmol/l		24	10,37	0,30
	Precilip, Nr. 320		20	3,67	0,63
	Humanserum		24	1,19	1,39
	Humanserum		20	3,44	0,74
	Humanserum		21	8,85	0,21

*) Boehringer Mannheim GmbH.

**) Serum stark trüb.

Tab. 4. Methodenvergleich

x-Werte = manuell bestimmte Werte. y-Werte = automatisch bestimmte Werte. Untersuchter Konzentrationsbereich für Cholesterin im Serum: 1,29–12,93 mmol/l.

Methode	Proben	Anzahl der Wertepaare	Regressions-Gerade	Korrelations-Koeffizient	Konfidenzbereich für wirkliche Steigung β^*
		n	$y = bx + a$	r	$< \beta <$
Braun SysteMatik	Humanseren	75	$y = 1,00 x - 1,15$	0,994	$0,98 < \beta < 1,03$
Eppendorf 5032	Humanseren	62	$y = 0,98 x + 1,98$	0,997	$0,96 < \beta < 1,00$
Greiner GSA II	Humanseren	17	$y = 0,99 x + 2,63$	0,998	$0,94 < \beta < 1,03$
L. Ljungberg Autolab	Humanseren	50	$y = 0,98 x + 0,97$	0,992	$0,94 < \beta < 1,01$
Perkin-Elmer C4	Humanseren	100	$y = 0,99 x + 2,76$	0,996	$0,98 < \beta < 1,01$
Perkin-Elmer C4B	Humanseren	57	$y = 0,97 x + 2,89$	0,996	$0,95 < \beta < 1,00$

*) berechnet nach l.c. (18) unter Zugrundelegung einer Regression 1. Art und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

Tab. 6. Cholesterin-Meßwerte in kommerziellen Kontroll-Seren. A = automatischer Meßwert. M = manueller Meßwert (enzymatische Methode). Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen. Cholesterin-Gehalt in mg/100 ml.

Kontroll-Serum	Sollwert*)	Braun SysteMatik		Eppendorf 5032		L. Ljungberg Autolab		Perkin-Elmer C4		Perkin-Elmer C4B	
		A	M	A	M	A	M	A	M	A	M
Precilip Nr. 319 B	169	144	142	141	140	140	145	147	142	146	148
Versatol**) Nr. 2455121	147	134	136	129	132	134	140	136	132	137	132
Versatol-A**) Nr. 2034033	95	75	76	79	80	82	86	79	76	81	80
Moni-trol I***) Nr. LTD-125 A, B	163	140	144	144	147	142	140	143	144	144	148
Moni-trol II***) Nr. PTD-32 A, B	142	103	105	104	105	104	108	103	105	106	105
CHOLESTROL D***) Nr. CTD-314	367	308	307	298	307	309	306	314	307	301	307

*) Liebermann-Burchard-Reaktion ohne Extraktion, mg/100 ml.

**) General Diagnostics Division, Morris Plains, N.J., USA.

***) Dade Division, Miami, Fla., USA.

Tab. 5. Wiederfindungsversuche. Aufstockung von Humanseren mit Preciset Cholesterin. Methode Eppendorf 5032. Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen.

Serum Nr.	Cholesterin-Konzentration [mmol/l]	Zugesetzte Menge Cholesterin [mmol/l]	Gefundene Menge Cholesterin [mmol/l]	Wiederfindung [%]
1	5,97	0,88	6,78	99
2	5,97	1,45	7,68	103
3	7,22	0,62	7,63	97
4	7,22	1,03	8,22	100
5	5,85	0,91	6,70	99
6	5,85	1,63	7,50	100
7	5,43	2,46	8,02	102

Tab. 7. Einfluß einer Hämolyse auf die Cholesterin-Bestimmung

Hämoglobin-Gehalt des Serums [g/l]	Eppendorf 5032 Cholesterin-Meßwert*) [mmol/l]	Perkin-Elmer C4
0	4,84	4,78
1,20	4,86	4,84
2,40	4,78	4,84
3,60	4,73	4,73
4,80	4,73	4,86
6,00	4,68	4,89
7,20	4,81	4,84
8,40	4,73	4,78
10,80	4,73	4,66

*) Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

Tab. 8. Einfluß einer Lipämie auf die Cholesterin-Bestimmung. Aufstockung von Humansen mit Preciset Cholesterin. (I) = Meßwert Braun SysteMatik. (II) = Meßwert Perkin-Elmer C4B. Mittelwerte aus jeweils zwei Bestimmungen.

Serum Nr.	Triglycerid-Konzentration [mmol/l]	Cholesterin-Konzentration [mmol/l]	Zugesetzte Menge Cholesterin [mmol/l]	Gefundene Menge Cholesterin [mmol/l]	Wiederfindung [%]
1	4,52	6,83 (I) 6,78 (II)	1,76 1,76	8,51 (I) 8,43 (II)	99 99
2	8,59	5,48 (I) 5,38 (II)	2,43 2,43	7,84 (I) 7,79 (II)	99 100
3	22,60	9,36 (I) 9,41 (II)	0,47 0,47	9,72 (I) 9,67 (II)	99 98

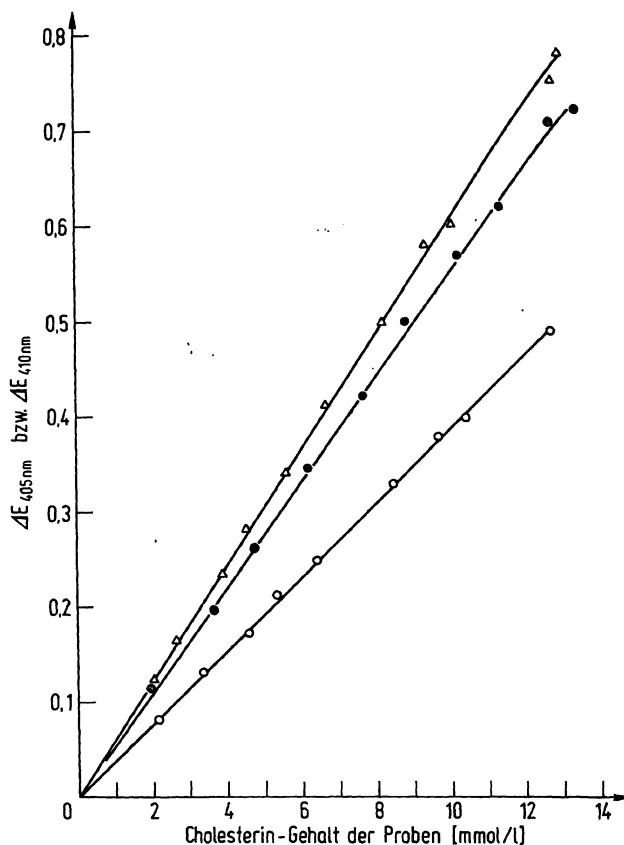


Abb. 3. Extinktionsdifferenz in Abhängigkeit von der Cholesterin-Konzentration.
 Δ : Meßwert Eppendorf 5032. \bullet : Meßwert Perkin-Elmer C4. \circ : Meßwert Perkin-Elmer C4B. Proben: Humansen. Ermittlung des Cholesterin-Gehalts der Proben mit manueller enzymatischer Methode.

Tag zu Tag, die mit Hilfe des Kontrollserums Precilip⁸⁾ ermittelt wurde, war mit Variationskoeffizienten von 0,9–2,7 % bei einem Meßzeitraum von jeweils 6–8 Tagen zufriedenstellend.

Zur Überprüfung der Richtigkeit wurden die Methoden mit dem manuellen enzymatischen Test verglichen, der seinerseits gut mit der Referenz-Methode nach Abell et al. (17) korreliert (10). Die in Tabelle 4 wiedergegebenen Versuchsergebnisse belegen, daß die Automaten-Methoden Cholesterin-Meßwerte lieferten, die mit den

⁸⁾ Boehringer Mannheim GmbH.

Tab. 9. Einfluß von Bilirubin auf die Cholesterin-Bestimmung

Serum Nr.	Bilirubin-Gehalt [mmol/l]	Eppendorf 5032 Cholesterin-Meßwert*) [mmol/l]	Perkin-Elmer C4B Cholesterin-Meßwert*) [mmol/l]
1	0	2,77	
	0,17	2,69	
2	0		3,13
	0,17		3,05
3	0	5,17	
	0,17	5,20	
4	0		6,83
	0,17		6,88
5	0	2,35	
	0,34	2,51	
6	0		2,69
	0,34		2,61
7	0	4,42	
	0,34	4,47	
8	0		5,87
	0,34		5,85
9	0	1,58	
	0,68	1,60	
10	0		1,78
	0,68		1,76
11	0	2,95	
	0,68	3,10	
12	0		3,91
	0,68		4,11

*) Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

Tab. 10. Einfluß von Antikoagulantien auf die Cholesterin-Bestimmung

Antikoagulans	Konzentration im Serum [mg/ml]	Eppendorf 5032 Cholesterin-Meßwert*) [mmol/l]	Perkin-Elmer C4 Cholesterin-Meßwert*) [mmol/l]
—	0	5,59	5,53
Citrat	1	5,56	5,48
	30	5,51	5,51
Oxalat	1	5,59	5,56
	30	5,51	5,38
Fluorid	2	5,61	5,48
	10	5,59	5,51
	30	5,59	5,46
Heparin	0,2	5,61	5,48
	2	5,59	5,48
EDTA	1	5,59	5,56
	10	5,48	5,48

*) Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

manuell erhaltenen Werten ausgezeichnet übereinstimmen. Nach Zusatz des wäßrigen Standards Preciset Cholesterin⁸⁾ zu Humanserum wurde die berechnete Menge quantitativ wiedergefunden (Beispiel Tab. 5). Die in kommerziellen Kontroll-Seren gemessenen Cholesterin-Konzentrationen lagen unter den angegebenen Sollwerten (Tab. 6). Dies ist verständlich, da mit den enzymatischen Methoden nur das Cholesterin (10), mit den zur Sollwert-Ermittlung eingesetzten chemischen Methoden hingegen auch noch andere Serum-Bestandteile wie Bilirubin und Serum-Proteine erfaßt werden (7, 8).

Hämolyse, Lipämie, Bilirubin, Antikoagulantien sowie die Pharmaka Ascorbinsäure, Novaminsulfon und α -Methyl-DOPA beeinflussten die Cholesterin-Bestimmungen nicht (Beispiele Tab. 7–11).

Die beschriebenen Methoden erwiesen sich im Rahmen der bisherigen Untersuchungen als spezifisch, störungsfähig und einfach durchführbar. Sie werden gegenwärtig in klinisch-chemischen Routinelabors einer ausgedehnten Erprobung unterzogen.

An der technischen Bearbeitung waren die folgenden Mitarbeiter beteiligt: Fräulein J. Bader, Fräulein H. Hoffmann und Frau K. Stephani.

Tab. 11. Beeinflussung der Cholesterin-Bestimmung durch Pharmaka in vitro.
Methode Perkin-Elmer C4.

Serum	Pharmakon	Konzentration im Serum [g/l]	Cholesterin-Meß- wert*) [mmol/l]
1	—	—	5,28
	Ascorbinsäure	0,25	5,38
	Ascorbinsäure	0,50	5,33
	Novaminsulfon	0,50	5,17
2	—	—	4,71
	Ascorbinsäure	0,25	4,78
	Ascorbinsäure	0,50	4,76
	Novaminsulfon	0,50	4,58
3	—	—	4,91
	Ascorbinsäure	1,0**)	4,94
	Novaminsulfon	1,16**)	4,78
	α -Methyl-DOPA	0,25**)	4,94

*) Mittelwert aus zwei Bestimmungen.

**) Ein Liter Serum enthält hier die Tages-Einzelmaximaldosis.

Literatur

1. Lynen, F. (1972), Naturwiss. Rundsch. 25, 382–391.
2. Irsigler, K. (1973), Wien. Klin. Wochenschr. 85, 195.
3. Schwandt, P. (1973), Internist 14, 325–329.
4. Salkowski, E. (1872), Pflügers Arch. 6, 207–212.
5. Liebermann, C. (1885), Chem. Ber. 18, 1803–1809.
6. Burchard, H. (1889), Dissertation, Rostock.
7. Brown, S. S. (1973), Ann. Clin. Biochem. 10, 146–154.
8. Tonks, D. B. (1967), Clin. Biochem. 1, 12–29.
9. Watson, D. (1960), Clin. Chim. Acta 5, 637–643.
10. Röschlau, P., Bernt, E. & Gruber, W. (1974), diese Z. 12, 403–407.
11. Nash, T. (1953), Biochem. J. 55, 416–421.
12. Pardue, H. L. (1969), Advan. Anal. Chem. Instrum. 7, 141–206.
13. Ingle, Jr., J. D. & Crouch, S. R. (1971), Anal. Chem. 43, 697–701.
14. Vorläufige Arbeitsanleitungen "Cholesterin, enzymatischer Farbtest" für Braun SystemeMatik, Eppendorf 5032, Lars Ljungberg Autolab, Perkin-Elmer C4 und Perkin-Elmer C4B (1974), Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.
15. Jaag, P. & Küffer, H. (1974), in Handbook Greiner Electronic Selective Analyzer GSA II, Greiner Electronic AG, Langenthal, Schweiz.
16. Hewitt, T. E. & Pardue, H. L. (1973), Clin. Chem. 19, 1128–1134.
17. Abell, L. L., Levy, B. B., Brodie, B. B. & Kendall, F. E. (1952), J. Biol. Chem. 195, 357–366.
18. Kreyszig, E. (1968), Statistische Methoden und ihre Anwendung, Verlag Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen.

Dr. J. Ziegenhorn
Boehringer Mannheim GmbH
Biochemica Werk Tutzing
8132 Tutzing/Obb.
Postfach 120

